云 南 植 物 研 究 8（2）：133—140，1986
Acta Botanica Yunnanica

岩蕨属植物配子体发育初报

马义伦　王伏雄

（中国科学院植物研究所）

摘要　本文为岩蕨属植物心岩蕨、岩蕨和耳羽岩蕨配子体个体发育和比较形态学初步研究。报道了用无机琼脂培养基由孢子培养配子体的方法。由孢子萌发到配子体成熟分四个时期：萌发期，原丝体发育期，过渡期和原叶体发育期。大多数原丝体发育到七个细胞，与顶端细胞相隔的原丝体细胞开始胞间细胞纵向分裂，进入过渡期。同时顶端细胞的横分裂受到抑制，直至原叶体顶端细胞形成开始原叶体发育期。岩蕨成熟配子体精子器盖细胞不分裂，耳羽岩蕨分裂为一个圆形细胞和一个镰刀形细胞，而心岩蕨两种情况兼而有之，配子体比较形态特征支持心岩蕨可能是以岩蕨和耳羽岩蕨为双亲的异源双二倍体的假设[5]。

关键词　岩蕨属；配子体发育；孢子培养

利用蕨类植物为材料开展发育生物学和生殖生物学研究，首先必须解决由孢子培育配子体和试管受精繁育孢子体的途径，因为自然繁殖不仅困难而且周期太长。岩蕨类植物小型岩隙生，广布于我国二十余省市山区，由于生境特殊，温室栽培很难成活，自然繁殖也很困难，有的种已濒于灭绝。岩蕨属（*Woodsia*）在蕨类植物的系统演化和分类中具有重要地位。Brown[1]曾报道过北美产的*W. oragana* Eat.，*W. scopulina* Eat.等岩蕨属四个种配子体发育形态。而蕨类植物配子体发育形态和繁殖方法的研究，在国内未见报道。

本文是岩蕨属三个种，心岩蕨（*W. subcordata* Turcz.）岩蕨（*W. ilvensis* R. Br.）和耳羽岩蕨（*W. polystichoides* Eat.）配子体发育和比较形态学初步研究，描述了配子体早期发育的形态发生，讨论种间的亲缘关系。并报道了用无机琼脂培养基由孢子培养配子体的方法。

材 料 和 方 法

配子体培养用的孢子前一年采自野外，凭证标本存中国科学院植物研究所标本馆（PE），产地等见表2，凭证标本由秦仁昌定名。

成熟孢子连同叶片用塑料袋密封存冰箱。用前，采收成熟孢子，7％（v/v）安替福民水溶液消毒30—60秒。在摇动中将孢子接种在琼脂平板上，密度约每平方厘米500

本文于1985年9月5日收到。

个。培养基配方列于表1，配方营养成分参考瑞士Basel大学Reichstein[6]改订的Meyer配方。此培养基适合于石灰岩生长的蕨类，具有较强缓冲性，琼脂平板较硬有利于播种时孢子分散。接种后黑暗吸胀72小时；光诱导96小时，为了避免孢子萌发产生的微量乙烯对萌发过程的抑制作用[4]，8—10时和15—17时置于室外日光下，11—14时日光灯下；再于黑暗中放48小时；最后于日光灯下培养，从接种到配子体成熟约需三个月。光诱导后，前二十天每天观察，两天取样一次，以后每五天取样一次，直至配子体成熟。每次取样用铬醋酸弱液固定一小时，水洗，代氏苏木精染色，油派胶（euporal）封整体片。

表1. 岩蕨属植物配子体培养基配方

Table 1. Nutrient medium employed in gametophyte culture of *Woodsia*.

代号 Code	营养成分 Nutrient		重量（克）/体积（升），蒸馏水 Weight(g)/vol(l), distilled water
	大量元素液 Macroelements		
A	磷酸氢二钠	$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	9.465
B	磷酸二氢钾	KH_2PO_4	9.070
C	硝酸氨	NH_4NO_4	5.0
D	硫酸镁	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4.0
E	氯化钙	$CaCl_2$	1.0
	铁储备液 Ferrous stock solution		
F	EDTA钠，	Sodium ECTA	3.7
	硫酸亚铁	$FeSO_4$	2.5
	微量元素储备液 Microelements stock solution		
G	硫酸锰	$MnSO_4$	0.040
	硫酸铜	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
	硫酸锌	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.030
	硼 酸	H_3BO_3	0.200
	钼酸氨	$(NH_4)_2MoO_4$	0.010
	碘化钾	KJ	0.010
	氯化锂	LiCl	0.010

配制：1.一升蒸馏水；2. 15克琼脂；3.A液30毫升，B液70毫升，C、D和E液各25毫升；4.铁储备液F 10毫升；5.微量元素储备液G10毫升。混匀，当量氢氧化钠水溶液调pH至6.5。

Ingredients of medium: 1. 1 litre of distilled water; 2. 15g of agar; 3. macroelements stock solutions: A. 30 ml, B. 70 ml, C. 25 ml, D. 25 ml, E. 25 ml, 4. F. 10 ml, 5. G. 10 ml. Mixed thoroughly. The pH Was regulated to 6.5 by an aquatic solution of sodium hydroxied in one equivatent concentration.

结 果

心岩蕨、岩蕨和耳羽岩蕨配子体早期发育分为四个时期，以心岩蕨为例观察结果如下：

萌发期，由孢子吸胀到第一个初生假根形成，约需15天。孢子周壁垂直于孢子裂缝开裂，细胞核向四分体痕移动，第一次有丝分裂为一个相等的核分裂，不等的细胞分裂，形成两细胞的原丝体（图版Ⅰ，7），包括一个大的绿色原丝体基部细胞和一个小的初生假根细胞。假根细胞在四分体痕一端，很快伸长与原丝体轴成约120°，逐渐液泡化，不再分裂。

原丝体发育期，由原丝体基部细胞开始有丝分裂，到原丝体胞间的细胞开始纵分裂，约需10—15天。大多数原丝体，从基部细胞分裂算起，进行六次横向分裂，产生七个绿色细胞（图1，1）。细胞核移向向基的细胞壁，新形成的原丝体细胞，核在中央，叶绿体集中在核周围，其它区域叶绿体的分布均匀。第二个原丝体细胞开始分裂时，原丝体基部细胞进行不等分裂，在第一个初生假根相对位置，形成第二个初生假根（图1，1和图版Ⅰ，8）。

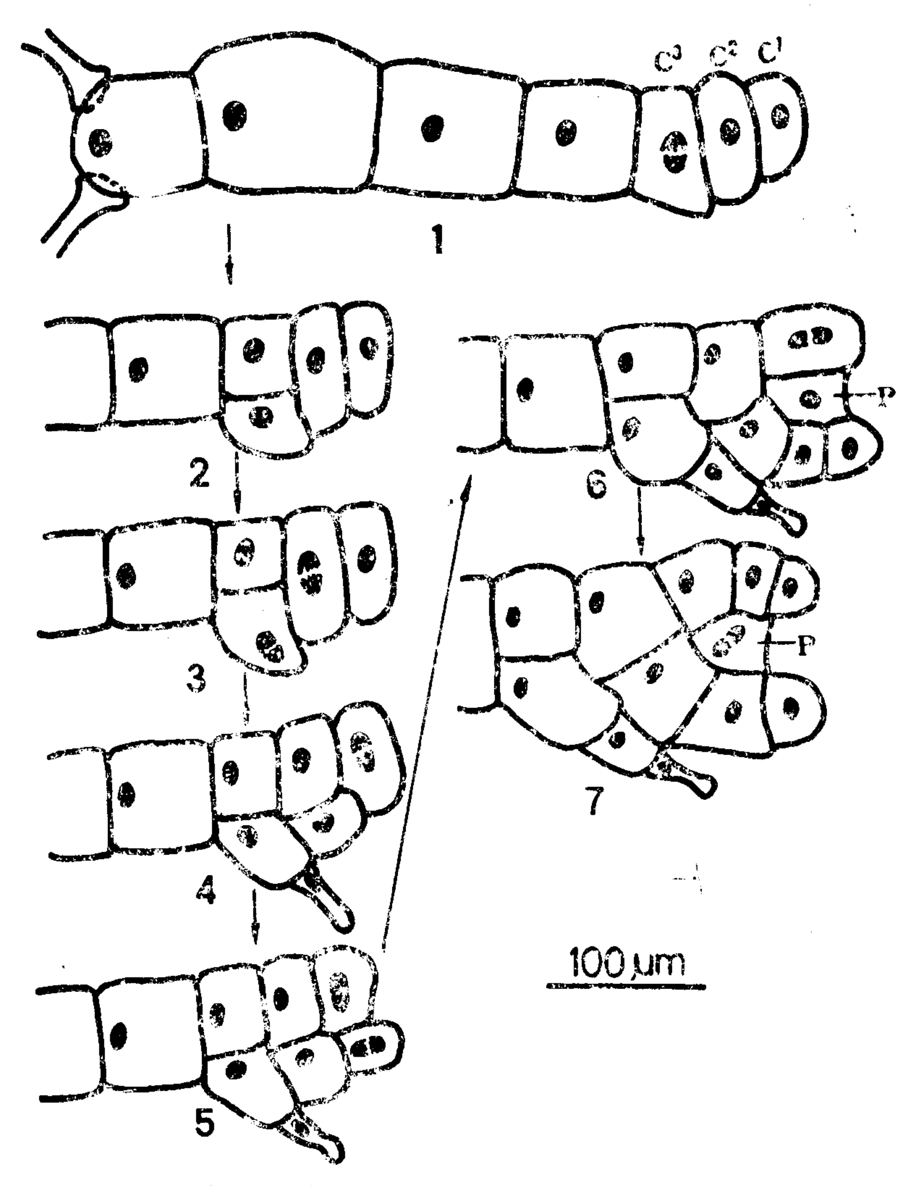


图1．心岩蕨配子体早期发育过渡期图解，由原丝体胞间分裂到幼少原叶体顶端细胞（P）形成。

Fig. 1. Early gametophyte development in *Woodsia subcordata*. The diagrams of the phase of transition between the interstitial division of protonema and the formation of apical cell of prothallus(P).

过渡期，由原丝体胞间的细胞分裂到原叶体顶端原始细胞开始分裂，是形态上的一维发育到二维发育的过渡阶段，约需7—10天。在原丝体密度不超过每平方厘米两个，20—25°C和日光灯下培养的条件下，大多数原丝体在七个细胞形成之后，与原丝体顶端细胞相隔的细胞C^3（图1，1）开始纵分裂，新形成的细胞壁与原丝体轴平行（在高密度培养条件下C^3仍然横分裂，使原丝体伸长），形成一个略大和一个略小的细胞(图1，2）。C^2以同样方式纵分裂，同时C^3的一个子细胞进行不等分裂，产生单细胞头状毛（图1，3—4）。顶端细胞C^1分裂形成两个细胞，一个纵分裂，另一个横分裂（图1，4—5），纵分裂向内产生一个原叶体顶端原始细胞P（图1，6—7），两侧的细胞先后横分裂，形成内凹的幼原叶体顶端（图1，7）。

原叶体发育期，由原叶体原始顶端细胞分裂到原叶体开始成熟，约需40—50天。原叶体顶端原始细胞倒三角形，以左右直斜交替分裂的方式发育形成心形。边缘细胞以不等细胞分裂方式在原叶体上半部形成单细胞头状毛（图版Ⅰ，4）在耳羽岩蕨的配子体中，有的不形成头状毛（图版Ⅰ，5),在过渡期原丝体细胞就开始产生次生的假根，原叶体的下半部细胞都可以产生次生假根，形成配子体的“尾部”（图版Ⅰ，13）。原叶体为单层细胞，在成熟前，中心区域细胞分裂平行于原叶体平面，形成多层细胞的垫层，而其它区域仍为单层细胞。在原叶体发育期，顶端是一个细胞还是几个细胞进行分生，尚需进一步观察。

成熟精子器是直径30—50 μm的圆球（图版Ⅰ，14），基部无柄细胞，直接着生于配子体腹面或背面。位于顶端凹入处之后，延伸到配子体后部，藏于假根中（图版Ⅰ，4、13）。精子器由第一环细胞，第二环细胞和盖细胞组成套层。耳羽岩蕨的精子器盖细胞分裂成一个圆形细胞和一个镰刀形细胞（图2，3—4）；岩蕨的盖细胞不分裂（图2，1—2）；而心岩蕨则一部分精子器盖细胞分裂（图2，7—8），一部分不分裂（图2，5—6）。颈卵器发生较晚，只着生于配子体腹面。位于顶端凹入处后部，凸出于垫状多层细胞表面，藏于假根之中（图版Ⅰ，3和13）。心岩蕨的颈卵器由四列细胞构成它的颈部（图2，10），多数向配子体后部弯曲（图2，9），长130—160 μm，直径50—60 μm。

讨　论

心岩蕨、岩蕨和耳羽岩蕨配子体早期发育基本一致，类似于其它薄囊蕨。配子体的形态随着播种密度、温度、光照和水分等不同培养条件可有变化[3]。在原丝体密度过大时，多形成细长线状，二歧分枝状（图版Ⅰ，10），甚至多分枝丝状的原叶体（图版Ⅰ，11）。Brown[1]认为岩蕨属植物配子体形态相似，没有分类学意义，事实上在相同低密度条件（如：少于两个原丝体/厘米^2），其它条件相同的培养条件下，配子体的形态是稳定的，在分类上有参考价值。心岩蕨、岩蕨和耳羽岩蕨用同一材料获得的细胞学资料和配子体的比较形态列于表2。心岩蕨是一个形态变异较大的种，分类学者争议较多，它的孢子体外部形态居岩蕨和耳羽岩蕨之间。这三个种的孢子有相似的周壁纹饰，基本相同的解剖学特征。作者用同一材料进行的细胞学研究[5]表明，心岩蕨可能

是以岩蕨和耳羽岩蕨为双亲的异源双二倍体能育种。可能的形成途径，是二倍体种杂交起源，通过无孢子生殖等方式，染色体加倍形成新种。配子体的形状（图版 I，1—3）和精子器的形态比较（表 2）支持这一假设。

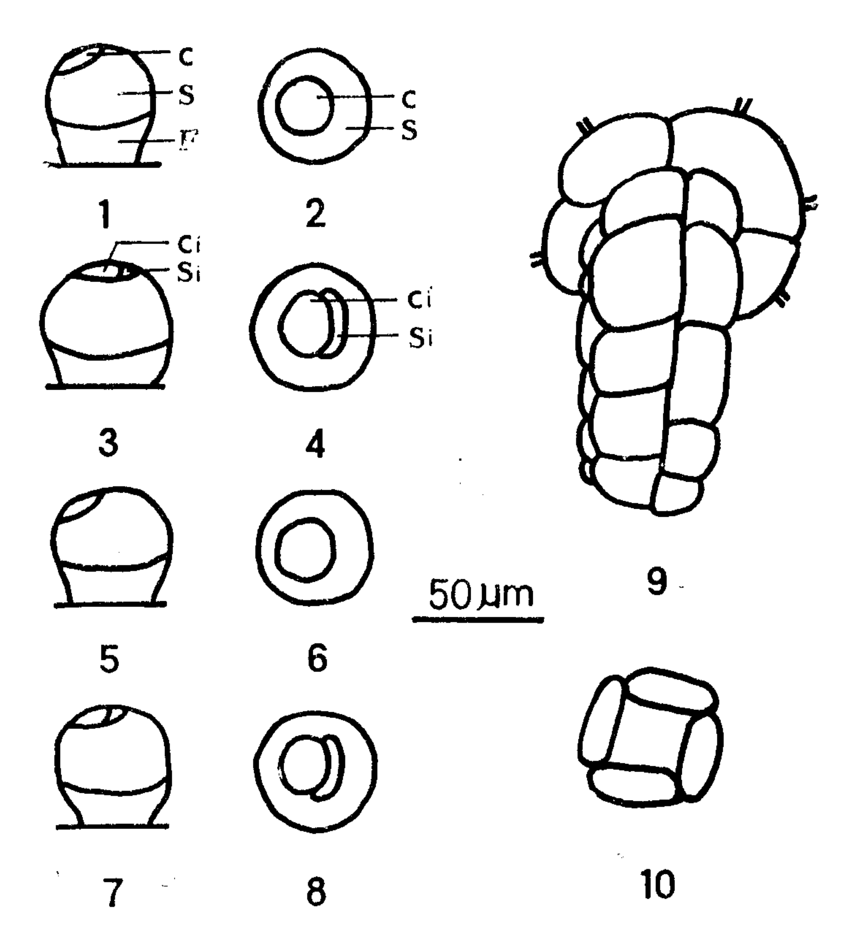


图2. 心岩蕨、岩蕨和耳羽岩蕨精子器和颈卵器图解 1.岩蕨精子器侧面观；2.岩蕨精子器顶面观；3 和 4.耳羽岩蕨精子器；5—8.心岩蕨精子器；9.心岩蕨颈卵器侧面观；10.心岩蕨颈卵器顶面观。C.盖细胞；S.第二环细胞；F.第一环细胞；Ci.圆形细胞；Si.镰刀形细胞。

Fig. 2. The diagrams of the antheridium and archegonium in *Woodsia subcordata*, *W. ilvensis* and *W. polystichoides*. 1. A lateral view of the antheridium in *W. ilvensis*; 2. An apical view of the atheridium in *W. ilvensis*; 3 and 4. The antheridium in *W. polystichoides*; 5—8. The antheridium in *W. subcordata*; 9. A lateral view of the archegonium in *W. subcordata*.; 10. An apical view of the archegonium in *W. subcordata*. C. The cap cell; S. The second ring cell; F. The first ring cell; Ci. The circular cell; Si. The sickle-shaped cell.

Schlumberger[7]认为桫椤科（Cyatheaceae）植物精子器盖细胞是分裂的，广义的水龙骨科（Polypdiaceae sensu lato）是不分裂的，岩蕨类植物则有的种分裂，有的种不分裂，因此在这一点上岩蕨类植物是这两个科植物的过渡类群，也就是说岩蕨类植物配子体形态，支持蕨类植物系统演化的桫椤科—岩蕨科—水龙骨科系列[2]。然而在岩蕨科植物的系统发育中，耳羽岩蕨的进化地位高于岩蕨，接近水龙骨科植物，而耳羽岩蕨配子体精子器盖细胞却是分裂的，类似于桫椤科植物。因此配子体比较形态学研究并不支持桫椤科—岩蕨科—水龙骨科进化路线的假设，更深入的蕨类植物配子体发育形态和比较形态学研究是需要的。

表2. 三种岩蕨属植物配子体的比较形态

Table 2. Comparative morphology of gametophytes of three species in *Woodsia*.

种名 Name of Species	岩蕨 *W. ilvensis*	耳羽岩蕨 *W. polystchoides*	心岩蕨 *W. subcordata*
* 成熟配子体长和宽之比 The ratio of length to width in mature gametophyte	1	1	约等于1 Approximately equivalent to 1
精子器盖细胞是否分裂 Whether the cap cell of antheridium is divided.	不分裂 Undivided	分裂 Divided	兼有 Both
染色体数目（配子体）Chromosome numbers of gametophyte	n = 39	n = 41	n = c. 80
倍性 Ploidy	2x	2x	4x
孢子数目 Spore numbers	64	64	64
产地 Locality	黑龙江密山 Heilongjing Mishan	辽宁凤凰山 Liaoning Fenghuangshan	辽宁凤凰山 Liaoning Fenghuangshan
凭证标本号，采集人 Voucher specimens	103，108张慈忠 Zhang Cizhong	205，106，81027马义伦 Ma Yilun	203，107，81036 马义伦 Ma Yilun
图号 Figure	Plate I, 1	Plate I, 2	Plate I, 3

* 成熟配子体长为从顶端到"尾部"长度；宽为垂直于"长"的最大宽度。

* By "length" it means the measurement from the apical cell to the "tail" of a gametophyte; while by "width" it means the measurement of the broadest place at right angle to the "length.

参 考 文 献

〔1〕 Brown, D. F. M., 1964: A monograpic study of the fern genus *Woodsia.*, Verlag Von J. Cramer, Weinheim.

〔2〕 Ching, R. C., 1940: *Sunyatsenia* 5: 21—268.

〔3〕 Dyer, A. F., 1979: The experimental biology of ferns. Chapter 9: 307—348. A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. London.

〔4〕 Fisher, R. W. & J. H. Miller, 1975: *Amer. J. Bot.*, 62: 1104—1111.

〔5〕 Ma Yilun, 1985: *Fern Gaz.*, 13 (1):17—24.

〔6〕 Reichstein, I., 1978: Raising of ferns from spores. (Personal correspondence with professor R. C. Ching)

〔7〕 Schlumberger, O., 1911: *Flora*, 102: 383—414.

A BRIEF REPORT OF DEVELOPMENT OF GAMETOPHYTES IN WOODSIA

Ma Yilun and Wang Fuxiong (Wang Fu-hsiung)

(Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract In the present paper the ontogeneses of gametophytes in *Woodsia subcordata* Turcz., *W. ilvensis* R. Br. and *W. polystichoides* Eat. have been reported briefly. The gametophytes used for experimental studies were obtained by means of culture from spores in the medium containing mineral components.

There are four phases in the early development of gametophytes of *Woodsia*, namely germination, protonemal development, transition and prothallus development. The filamentous phase ends, in most cases, after seven chlorocytes have been formed by apical cell division at right angle to the axis of the protonema, when interstitial divisions are initiated by the third cell from the apical one at the beginning of transition. At the same time the division of the apical cell of protonema is inhibited. When the apical cell of the young prothallus is newly formed the phase of prothallus development begins. In mature gametophytes the cap cell of antheridium is usually divided into a circular cell and a sickle-shaped one in *W. polystichoides*; the cap cell is undivided in *W. ilvensis*; while in *W. subcordata* the two types of the cap cells can be seen on the same gametophyte. The comparative morphology of the gametophytes of the three species well supports the hypothesis [5] that *W. subcordata* may be an allotetraploid derived from *W. ilvensis* and *W. polystichoides*.

Key words *Woodsia*; Development of gametophytes; Spore culture

图 版 说 明

图版Ⅰ. 三种岩蕨属植物的配子体 1—3.培养基上生长的成熟配子体 1.岩蕨; 2.耳羽岩蕨; 3.心岩蕨。4—5.耳羽岩蕨成熟配子体 4.边缘着生单细胞头状毛; 5.边缘无头状毛。6—14.心岩蕨配子体个体发育 6.萌发的孢子; 7.基部细胞和假根细胞构成的原丝体; 8.两个绿色细胞的原丝体; 9.幼少的原叶体; 10—11.拥挤条件下生长的原叶体; 12.尚未成熟的原叶体; 13.成熟的配子体; 14.精子器。 a.精子器, c.颈卵器。

Explanation of the Plate

Plate 1. The gametophytes of three species in *Woodsia* 1—3. Mature gametophytes on culture media 1. *Woodsia ilvensis*; 2. *W. polystichoides*; 3. *W. subcordata*. 4—5 The muture gametophytes of *W. polystichoides* 4. unicellular papillate hair on the margin; 5. without papillate hair on the margin. 6—14 The ontogenesis of gametophyte in *W. subcordata* 6. spore germination, 7. basal cell and rhizoid cell forming the protonema; 8. two chlorocytes of protonema; 9. young prothallus; 10—11. one of the prothalluses in higher intensities; 12. immature prothallus; 13. mature gametophyte; 14. antheridium. a. Antheridium; c. Archegonium.